대한의진균학회지 제 1권 제 1호 1996
Kor J Med Mycol Vol. 1, No. 1, 1996

■원 저■

*Candida albicans*의 표면 iC3b 수용체 발현 및 혈관 내피세포에 대한 유착

연세대학교 의과대학 피부과학교실

이광훈 · 윤문수 · 윤경한 · 최현주

=Abstract=

Expression of iC3b Receptor on *Candida albicans* and Its Role on Adhesion of the Yeast to Human Dermal Microvascular Endothelium

Kwang Hoon Lee, Moon Soo Yoon, Kyung Han Yoon and Hyun-Joo Choi

Department of Dermatology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: The adherence of microorganisms to host tissue is an important process in the pathogenesis of fungal infection. A protein that shares antigenic and structural homology with the α-subunit of leukocyte adhesion glycoprotein CD11b/CD18, also known as iC3b receptor, Mo-1 or Mac-1, has been isolated from the surface of *C. albicans.*

Objective: This study was done to observe the changes in the expression of iC3b receptor on *C. albicans* by glucose or immunosuppressive agents and to elucidate the effect of glucose and anti-iC3b receptor antibodies on adhesion between human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) and *C. albicans.*

Methods: We utilized immunofluorescence study and immunofluorescent flow cytometry and the binding assay of *C. albicans* to cultured HDMEC in vitro and blocking assay using monoclonal antibody were performed.

Results: Immunofluorescence study and immunofluorescent flow cytometric analysis demonstrated surface expression of iC3b receptor on *C. albicans.* The expression of surface iC3b receptor on *C. albicans* in creased in a dose dependent manner with increasing concentrations of glucose, cyclophosphamide and prednisolone. The adherence of *C. albicans* to HDMEC correlated positively with glucose levels. The adherence of *C. albicans* to HDMEC decreased significantly by the treatment with anti-iC3b receptor antibodies.

Conclusion: The results suggest that iC3b receptors should be involved in the adherence of *C. albicans* to vascular endothelial cells and may be involved in the pathogenesis of hematogenous candidiasis.

Key Words: *Candida albicans,* iC3b receptor, Human dermal microvascular endothelial cells, Adhesion

* 이 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.
†별책요청 저자: 이광훈, 서울특별시 서대문구 신촌동 134 연세대학교 의과대학 피부과학교실, 우편번호 120-752

서 론

타협(immunocompromised) 숙주에서 진균성 기회감염의 빈도는 현저히 증가하고 있으며, *Candida albicans*는 면역타협 숙주에서 발생하는 전신성 진균감염증의 가장 흔한 원인균이다[1-2]. 전신성 진균 감염증의 선행유발인자로서 호중구 감소증, 과혈당증, 부신피질 홀몬제, 과영양수액 및 광범위 항생제 투여, 그리고 정맥 카테터의 사용 등이 알려져 있다[3]. 칸디다 감염증은 신생아, 후천성 면역결핍증후군 또는 악성종양 및 장기이식 후 면역억제제의 사용에 의한 면역저하 환자들에서 높은 유병율과 치사율을 보인다[2,3].

숙주 조직에 대한 세균의 유착과정은 세균감염의 발병기전에 매우 중요한 단계로 인체와 실험동물에서 세균유착기전을 이용한 감염의 약화 혹은 예방적 측면의 연구가 시도되고 있다[4,5]. 생체내에서 칸디다균의 병원성은 시험관내 효모균 유착과 직접적으로 상관되는 것으로 알려져 있다[6]. 그러나 숙주조직과 세포외기질에 대한 효모균의 유착을 중개하는 분자적 기전은 아직 확실히 규명되어 있지 않다.

면역반응과 염증반응에서 숙주 방어기전에 관여하는 염증세포의 표면에는 보체세편(complement fragment)에 대한 수용체가 존재하는데, 제3보체(complement 3: C3)의 여러 분해 세편을 인지하는 수용체군인 complement receptor(CR)1, CR2, CR3는 미생물에 대한 분해세편의 부착에 관여하기 때문에 특히 중요한 분자로 알려져 있다. CR1은 C3 분해세편중 C3b에, CR3는 iC3b에 CR2는 C3d에 대한 수용체이며, 이들의 세포표면 분포는 염증세포 간에 차이를 보인다. 즉 B림프구는 CR1과 CR2를, 호중구와 단구는 CR1과 CR3를 표현한다[7]. CR3는 β2 integrin군인 leukocyte cell adhesion molecule(LEUCAM) 유착분자군에 속하고 CD11b/CD18 이중 이합체(heterodimer)분자로 Mo-1, Mac-1, iC3b수용체 등으로도 불리우며, 포유동물의 호중구, 단구, 대식세포의 표면에 분포하여, 미생물에 대한 옵소닌작용에 관여한다. *C. albicans*의 표면으로부터 CD11b/CD18의 α-subunit인 CD11b와 항원성 및 구조가 동일한 단백이 분리되고 이 단백의 특성이 규명되었다[8-10]. 면역블롯검사와 면역침강검사에서도 *C. albicans* 표면에서 분리된 단백은 호중구 CD11b/CD18의 α-subunit와 같은 130-165kD의 단일대를 나타낸다[10-11].

*C. albicans*의 표면에서 분리된 CD11b 유사분자는 염증세포의 옵소닌작용을 억제하거나, 혹은 배위자(ligand)에 대해 식세포의 수용체와 경쟁하여 식균작용을 감소시킴으로써 칸디다균의 조직침윤을 유발시킬 것으로 추정되고 있다[12]. 혈관내피세포는 혈관의 가장 내측에 위치하기 때문에 *C. albicans*가 혈행성 전신성 감염을 유발하려면 혈관 내피세포와 일차적으로 유착하여 주변조직으로 이동하여야 한다.

본 실험에서 연구자는 iC3b 수용체에 대한 단클론 항체를 이용한 면역형광검사와 면역형광유량 세포분석법을 시행하여 포도당 및 면역억제제에 의한 *C. albicans* 세포표면의 iC3b수용체 발현변화를 관찰하였고, 배양한 인체 진피 미세혈관내피세포(human dermal microvascular endothelial cells: HDMEC)에 대한 *C. albicans*의 유착실험과, iC3b수용체에 대한 단클론 항체를 이용한 유착저해실험을 시행하여 포도당과 항 iC3b수용체 항체가 HDMEC과 *C.albicans*의 유착에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험균주 분리배양

iC3b수용체 발현에 관한 실험에는 혈액으로부터 분리한 균주로서 *C. albicans* American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, U.S.A.) 44808주, ATCC66396주와 *C. glabrata* ATCC 15545주를 사용하였다. 또한 연세대학교 의과대학 세브란스병원 피부과에 내원한 칸디다 감염증 환자의 점막 및 피부로 부터 분리한 칸디다균종중 Yeast Biochemical Card(Vitek^R, Hazelwood, MO, U.S.A.), 형태학적 검사와 germ tube expression에 의해 동정한 *C. albicans* 가칭 Yonsei University Culture Collection(YUCC)3153주와 YUCC3158주와 YUCC3158주, 한국종균협회 부설 한국미생물보존센타(Korean Culture Center of Microorganisms: KCCM, 36801주 등 3주, *C. parapsilosis* YUCC3302주, YUCC3475주, YUCC3479주, KCCM35428주 등 5주, *C. tropicalis* YUCC6661주, KCCM35431주 등 2주, *C. krusei* KCCM11426주와 *C. guilliermondii* YUCC3463주 등 총 15균주를 사용하였다. 혈관내피세포 유착실험에는 *C. al-*

bicans ATCC44808주를 사용하였다. 균주는 Sabouraud 액체배지에서 적정시간 배양한 후 집락수와 420nm에서 광학밀도를 측정후 사용시까지 영하 70℃에 보관하였다. 실험전 RPMI1640 배지(Gibco Laboratories, Grand Island, NY, U.S.A.), Sabouraud 액체배지와 2% dextrose, 0.15% L-asparagine, yeast nitrogen base가 함유된 yeast extract 배지에 접종하고 실온에서 16시간 배양후, 효모균을 모아 PBS로 3회 세척한 다음, 420nm에서 0.5의 광학밀도가 되도록 희석하여 사용하였다.

포도당 농도가 iC3b 수용체 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위해, 2% Sabouraud 액체배지에서 16시간 배양후, 2%, 5%, 10% 포도당을 각각 추가한 RPMI1640 배지에서 다시 16시간 배양하였다. 또한 면역억제제가 iC3b수용체의 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위해 적정농도의 cyclophosphamide 또는 prednisolone을 배지에 첨가한 후 16시간 배양하였다.

2. 단클론 항체

보체절편 iC3b와 반응하는 CR3의 α subunit를 인식하는 단클론 항체로서 항 Mo-1(mouse IgM, Coulter Immunology, Hialeah, FL, U.S.A.), 항 CD 11b 클론 44(mouse IgM1, R&D systems, Minneapolis, MN, U.S.A.), Leu5(mouse IgG2a, Becton Dickinsom, San Jose, CA, U.S.A.), M1/70(rat IgG 2b, ATCC)와 β subunit를 인식하는 CD18(mouse IgG1, R&D systems, Minneapolis, MN, U.S.A.)등을 사용하였다.

M1/70(ATCC)은 ATCC로부터 구입한 하이브리도마 세포주를 10% 우태아(牛胎兒) 혈청을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium에서 배양한 다음 상청액을 수집하여 농축기로 농축하였다. Sephadex G-25 column(PD-10 column, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)으로 염을 제거한 후 protein G sepharose affinity column(HiTrap Protein G column, Pharmacia Biotech)의 상단에 가하였다. Column을 20mM Na-phosphate 완충용액, pH7.0으로 세척하고 0.1M glycine-HCl, pH2.7 완충용액을 가한 후 유출액을 수집하였다. 단핵세포에 대한 면역형광 유량 세포분석 및 면역형광검사를 시행하여 유출액에서 항체를 검정한 후 사용하였다.

3. 면역형광검사

세포배양유리(Lab Tek Chamber^R, Miles Lab. Naperville, IL, U.S.A.)에서 배양된 *C. albicans*를 1% paraformaldehyde로 고정시킨 후 iC3b수용체에 대한 단클론 항체를 넣고 30분간 반응시킨 다음 fluorescein isothiocyanate(FITC) conjugated antimouse IgG(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.), antimouse IgM(Sigma), 또는 antirat IgG (Sigma)와 30분간 반응시키고 면역형광현미경으로 관찰하였다.

4. 면역형광 유량 세포분석

상기와 같이 여러 조건에서 적정시간 배양한 5 × 10^7 colony forming unit(cfu)/ml의 칸디다균주를 PBS로 3회 세척 후 항체염색을 위해 각 시험관으로 분주하였다. 0.5% bovine serum albumin (BSA, Sigma)이 함유된 PBS(BSA-PBS)로 적절히 희석한 인체 호중구의 CD11b/CD18의 α subunit 에피토프를 인식하는 단클론 항체를 각 시험관에 10 μl씩 넣은 후 얼음속에서 30분간 반응시킨 다음 BSA-PBS로 3회 세척 후 BSA-PBS를 이용하여 1: 20으로 희석한 FITC-conjugated goat anti-mouse IgM(Sigma), FITC-conjugated anti-mouse IgG(Sigma) 또는 FITC-conjugated anti-rat IgG (Sigma)등을 넣고 30분간 반응시켰다. BSA-PBS로 다시 3회 세척한 후 fluorescence activating cell sorter(FACStar, Becton-Dickinson, Lincoln, NJ, U.S.A.)를 이용하여 iC3b수용체의 세포표면 발현양상을 측정하였다. 죽은 세포는 propidium iodide (Sigma)로 처리하였다.

5. 인체 진피 미세혈관 내피세포의 분리 배양

신생아 포피로부터 종전의 방법에 따라 HDMEC를 분리하였다[13]. 신생아 포피를 3mm 크기의 소절편으로 잘게 잘라 0.03% trypsin(Sigma) 및 1% ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA, Sigma)가 함유된 PBS으로 37℃에서 10분간 처리한 후 scalpel blade 옆면을 이용하여 각각의 소절편을 눌러 절단면으로 부터 미세혈관편이 빠져 나오도록 하였다. Hank's balanced salt solution (HBSS)으로 혼합한 35% Percoll(Pharmacia Fine chemicals AB, Uppsala, Sweden)용액을 원침관에 넣고 4℃, 30,000xg에서 10분간 원침하여 밀도구배를 만든 다음 상단에 미세혈관편이 함유된 용

액 1ml를 가한 후 400xg로 실온에서 15분간 다시 원침시켰다. 밀도 1.048g/ml 이하의 분획(원침시킨 후 나타나는 중간의 백색층)을 다른 원침관에 옮기고 HBSS로 채워 400xg로 실온에서 15분간 다시 원침시킨 후 그 침전물을 미리 gelatin(Sigma)을 처리한 조직 배양용기에 넣고 epidermal growth factor 1ng/ml(Clonetics Corp , San Diego, CA, U.S.A.), hydroco-rtisone acetate 1 μg/ml(Sigma), dibutyryl cyclic AMP 5×10^{-5}M(Sigma), glutamine (Sigman) 2×10^{-9}M, penicillin 100U/ml, streptomycin 100 μg/ml, amphotericin B 250 μg/ml (Sigma), 30% 인체 AB혈청이 함유된 endothelial basal media(Clonetics Corp., San Diego, CA, U.S.A.)로 37℃, CO_2 항온기에서 배양하였다. 배양용기에 부착된 후 역위상차현미경(inverted phase contrast microscope)하에서 내피세포외의 다른 세포들을 멸균 소독된 25게이지 주사침으로 제거하였다. 형태학적 검사 및 면역형광검사를 시행하여 배양된 세포가 순수함을 확인한 후 2-8계대의 HDMEC을 실험에 사용하였다. 형태학적 검증은 역위상차현미경으로 평가하였으며, von Willebrand's factor(vWF)의 발현은 면역형광검사로 평가하였다. 세포배양유리에서 배양된 HDME-C을 100% 메탄올로 영하 20℃에서 10분간 고정시킨 후 1:40으로 희석한 rabbit anti-human vWF(anti-factor VIII-associated antigen, Behring Diagnostics, La Jolla, CA, U.S.A.)를 넣고 30분간 반응시킨 다음 FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma)와 30분간 반응시키고, 면역 형광 현미경으로 관찰하였다.

6. *C. albicans*-내피세포 유착실험

바닥이 편평한 96well 조직 배양용기에 well당 4×10^4 세포의 밀도로 HDMEC을 검사 48시간 전에 넣고 배양하였다. PBS로 3회 세척한 *C. albicans*에 methionine이 함유되지 않은 배지에 넣고 37℃에서 20분간 배양하였다. 동위원소 ^{35}S-methionine(Dupont, Boston, MA, U.S.A.)을 10^7 세포당 100 μCi/ml의 농도로 넣고 16시간 진탕 배양하였다. 원심분리 후 수집한 균을 HBSS 용액으로 2회 세척한 다음 적절한 농도로 희석하여 사용하였다. 각 well에 배양된 내피세포의 단층에 동위원소 ^{35}S이 부착된 *C. albicans*를 적정비율로 100 μl씩 가하고 37℃에서 적정시간 반응시킨 후 56℃에서 30분간 열처리하여 비활성화한 5% 우태아 혈청(Gibco)을 함유한 HBSS로 가볍게 2회 세척하였다. 유착된 세포를 1% triton-X로 용해한 후 부유액을 수집하여 방사선 베타 측정기에서 수집된 가검물로부터 방출되는 방사선량을 측정하였다. 유착된 *C. albicans*의 백분율을 다음과 같이 구하였다.

$$\textit{C. albicans}\ \text{유착도의 백분율} = \frac{\text{유착된 } \textit{C. albicans}\text{의 방사선량} - \text{기본방사선량}}{\text{well에 첨가된 } \textit{C. albicans}\text{의 총방사선량} - \text{기본방사선량}} \times 100$$

7. *C. albicans*-내피세포 유착저해실험

각 well의 HDMEC 단층에 iC3b수용체에 대한 단클론 항체를 20 μg/ml의 농도로 100 μl씩 넣고 37℃에서 45분간 반응시킨 후 항체가 존재하는 상태에서 ^{35}S를 부착시킨 *C. albicans*를 넣고 *C. albicans*-HDMEC 유착실험을 시행한 다음 항체의 존재여부에 따른 유착정도를 비교하여 유착저해정도를 측정하였다.

8. 통계처리

본 실험의 측정수치는 평균±표준편차로 표시하였다. 통계학적 분석은 Wilcoxon rank sum test와 Kruskal-Wallis test 등의 비모수검정법으로 검정하였고, p값이 0.05 미만인 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. *C. albicans* 표면 iC3b 수용체의 발현

가. 배양한 *C. albicans*의 면역형광 검사 소견

아이소타이프(isotype) 면역글로불린 mouse IgM과 rat IgG2b를 처치 후에는 형광침착을 관찰할 수 없었으나 iC3b 수용체에 대한 단클론 항체 항 Mo-1과 ATCC M1/70 배양 상청액으로부터 친화성 크로마토그라피를 이용하여 순수정제한 항 Mac-1 항체 처치후에 균포자 및 균사의 변연부에 동일하게 침착된 형광발현을 관찰할 수 있었다(그림 1).

나. *C. albicans* 표면 iC3b수용체의 발현 양상

Sabouraud 배지에서 16시간 배양한 *C. albicans*의 면역형광검사상 iC3b수용체에 대한 단클론 항체 항 Mo-1과 ATCC M1/70 배양 상청액으로부터 친화성 크로마토그라피를 이용하여 순수정제한 항 Mac-1 항체 처치후에 균포자 및 균사의

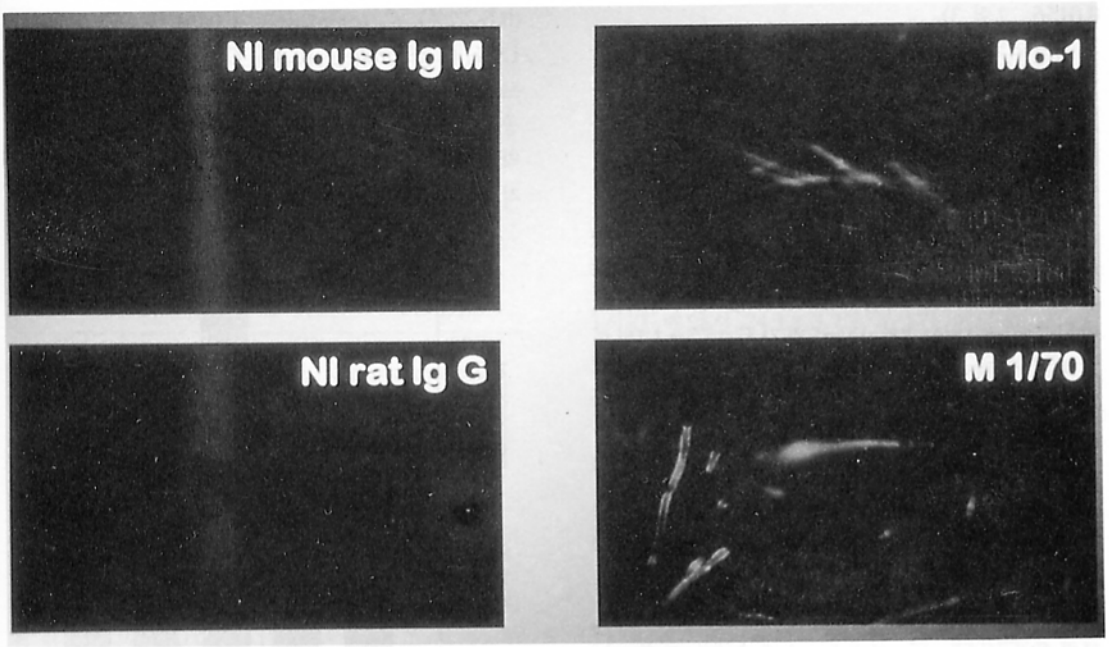

Fig. 1. Immunofluorescence microscopy of *C. albicans* after incubation with monolconal antibody Mo-l and M1/70.

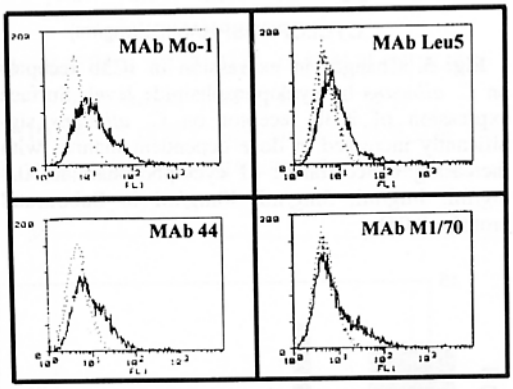

Fig. 2. Surface expression of the iC3b receptor on *C. albicans* as determined by immunofluorescence flow cytometric analysis with monoclonal antibody Mo-l, Leu5, 44, and M1/70.

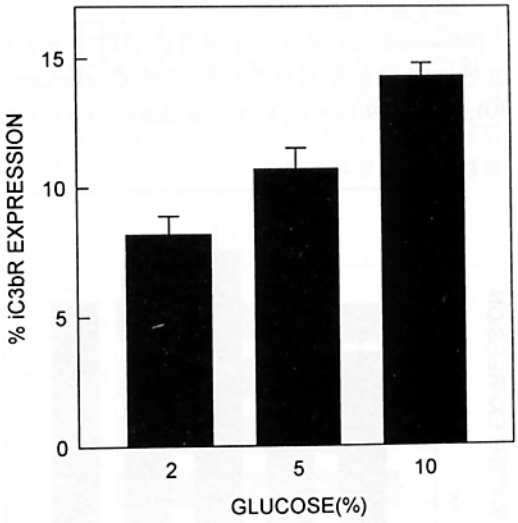

Fig. 3. Changes in expression of iC3b receptor on *C. albicans* by glucose level. Surface expression of iC3b receptor on *C. albicans* significantly increased in dose dependent manner with increasing concentration of glucose, 2%, 5%, 10% in Sabouraud broth(p<0.05).

변연부에 동일하게 침착된 형광발현을 관찰할 수 있었다. 면역형광 유량 세포분석 검사상 2% Sabouraud 액체배지에서 16시간 배양한 *C. albicans*의 8.2%에서 iC3b수용체가 발현되었다(그림 2).

포도당이 iC3b수용체 발현에 미치는 영향을 보기 위해 Sabouraud 사면배지에서 배양한 *C. albicans*를 2%, 5%, 10%의 각기 다른 포도당 농도가 함유된 Sabouraud 액체배지에 재배양 후 iC3b 수용체의 발현정도를 면역형광 유량 세포분석법을 이용하여 비교분석하였다. 2% 포도당에서는 8.2±0.7%의 *C. albicans*가, 5%와 10% 포도당에서는 각각 10.7±0.8%와 14.3±0.5%의 *C. albicans*가 iC3b수용체를 발현하여 포도당 농도에 비례하여 유의하게 발현증가를 나타내었다(p=

0.0156, 그림 3).

면역억제제가 *C. albicans* 표면 iC3b수용체 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위해 각기 다른 농도의 prednisolone과 cyclophosphamide를 첨가한 배지에서 배양한 *C. albicans*의 iC3b수용체 발현 양상을 비교분석하였다. Prednisolone 첨가전의 10% Sabouraud 액체배지에서 배양한 *C. albicans*는 11.2±0.8%에서 iC3b수용체 발현을 나타낸 반면 prednisolone 100 μg/ml이 함유된 배지에서 배양시 14.2±0.9%, 200 μg/ml 첨가시 15.5±1.1%로 최대치에 달하였다가, 300 μg/ml, 400 μg/ml에서는 각각 14.6±0.6%, 13.4±0.5%로 iC3b수용체 발현정도가 지속되었다(p=0.0266, 그림 4).

Cyclosphosphamide 첨가시에도 첨가전 11.9±0.5%에서 100 μg/ml 첨가시 13.5±0.9%, 1mg/ml 첨가시 22.3±1.5%로 최대치에 달하였다가 5mg/ml, 10mg/ml 첨가시 각각 19.0±0.7%, 18.8±2.2%로 iC3b 수용체 발현정도가 지속되었다(p=0.0121, 그림 5).

다. 칸디다 균종과 분리병소의 차이에 따른 iC3b수용체 발현 양상

Sabouraud 액체배지에서 배양한 칸디다 균종간 표면 iC3b수용체 발현양상을 보면 *C. albicans*는 9.0±3.2%(5.9-13.6%), *C. parapsilosis*는 1.6±0.6%(0.6-2.2%), *C. tropicalis*는 1.1±0.4%, *C. krusei*는 1.9%, *C. glabrata*는 10.8%, *C. guillemondii*-는 0.7%로 *C. albicans*와 *C. glabrata*에서만 발현되어 균종간 뚜렷한 차이를 보였다(그림 6). 피부 및 점막으로부터 분리된 2주의 *C. albicans* 균종에서는 각각 5.9±0.3%와 8.7±1.7%에서 iC3b수용체 발

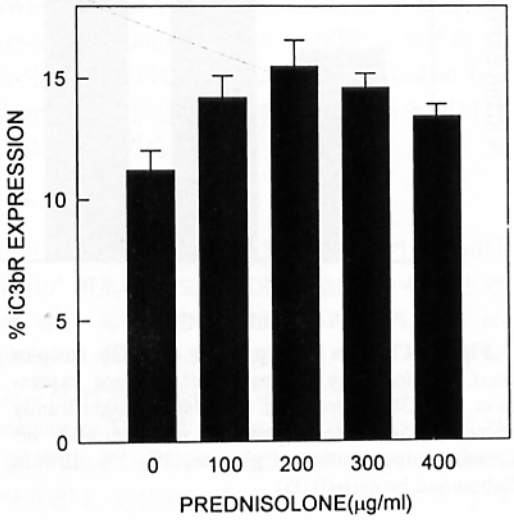

Fig. 4. Changes in expression of iC3b receptor on *C. albicans* by prednisolone level. Surface expression of iC3b receptor on *C. albicans* significantly increased in dose dependent manner with increasing concentration of prednisolone, 100 μg/ml, 200 μg/ml, 300 μg/ml, 400 μg/ml in Sabouraud broth(p<0.05).

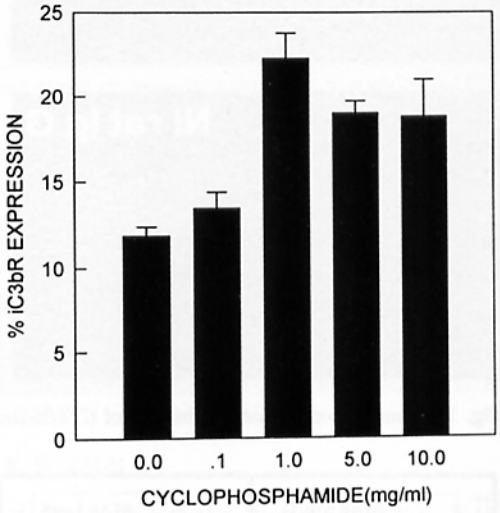

Fig. 5. Changes in expression of iC3b receptor on *C. albicans* by cyclophosphamide level. Surface expression of iC3b receptor on *C. albicans* significantly increased in dose dependent manner with increasing concentration of cyclophosphamide, 0.1 mg/ml, lmg/ml, 5mg/ml, l0mg/ml in Sabouraud broth(p<0.05).

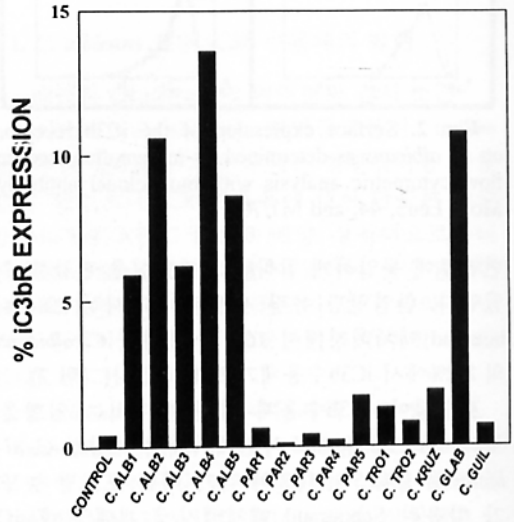

Fig. 6. Surface expressions of iC3b receptor on the different species of candida as determined by immunofluorescence flow cytometric analysis.

Table 1. Expression of the iC3b receptor on *C. albicans*

Candida species	Percentage fluorescence*
Blood isolates	
C. albicans ATCC 44808	12.0±2.0
C. albicans ATCC 66396	8.8±0.3
Skin isolates	
C. albicans YUCC 3153	8.7±1.7
C. albicans YUCC 3158	5.9±0.3

Surface expression of the iC3b receptor on *C. albicans* isolated from blood, skin, or mucosal surface as determined by flow cytometry.
*: Mean±S.D.

현을 보였으며, 패혈증 환자의 혈액에서 분리된 2주의 *C. albicans*균종에서는 각각 12.0±2.0%와 8.8±0.3%에서 관찰되었다. 혈액에서 분리된 균주일수록 iC3b수용체의 발현이 높았으나 통계학적 유의성은 없었다(표 1).

2. 인체 진피 미세혈관 내피세포에 대한 *C. albicans*의 유착

가. 포도당이 인체 진피 미세혈관 내피세포 - *C. albicans*의 유착에 미치는 영향

HDMEC에 대한 *C. albicans*의 유착정도를 알아보고 iC3b수용체가 혈관내피세포에 대한 *C. albicans*의 유착과 관련있는지를 관찰하기 위해 배양한 HDMEC과 *C. albicans*의 유착실험을 시행하였다. 첨가한 *C. albicans*의 수와 배양시간에 따른 HDMEC에 대한 *C. albicans*의 유착 정도를 비교한 예비실험 결과 *C. albicans* 5×10^5cfu 수에서는 25.1±3.8%의 유착도를 보였으며 1×10^6과 2×10^6cfu 에서는 각각 29.9±2.2%와 28.3±1.5%의 유착도를 나타내었고, 30분 배양시 8.1±1.9%, 1시간 배양시 24.1±3.7%, 2시간 배양시 25.4±4.9%로 1시간 배양시 유착정도가 유의하게 증가하여 이후의 유착실험은 10^6cfu의 *C. albicans*를 1시간 배양조건으로 시행하였다. 포도당이 HDMEC-*C. albicans* 유착에 미치는 영향을 관찰하기 위해 각기 다른 농도의 포도당이 함유된 RPMI1640배지에서 배양한 *C. albicans*의 유착도는 14.3±0.8%였으며, 5%와 10% 배지에서 배양시 각각 18.5±3.3%, 23.0±3.3%로 포도당 농도가 높은 배지에서 배양한 *C. albicans*일수록 HDMEC에 대한 유착도가 유의하게 증가하였다 (p=0.0390, 그림 7).

나. 항 iC3b수용체 항체가 인체 진피 미세혈관 내피세포 - *C. albicans* 유착에 미치는 영향

HDMEC - *C. albicans* 유착에 iC3b수용체가 관여하는지를 알아보고자 iC3b수용체 분자에 대한 단클론 항체를 이용하여 유착저해실험을 시행하

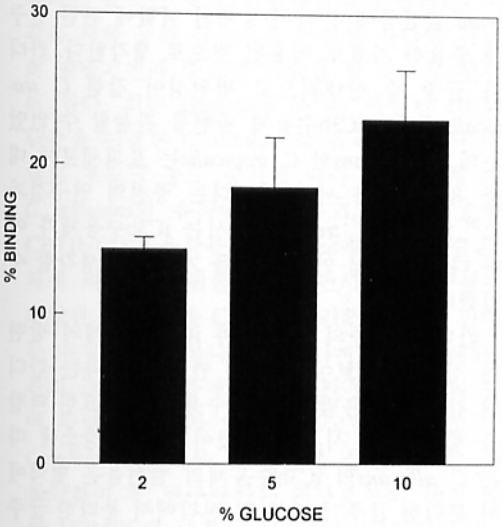

Fig. 7. Changes in the adhesion of *C. albicans* to HDMEC by glucose levels. ^{35}S-radiolabeled *C. albicans* were treated to HDMEC monolayer cultured with RPMI1640 containing 2%, 5%, 10% glucose for 1 hour in 37℃.

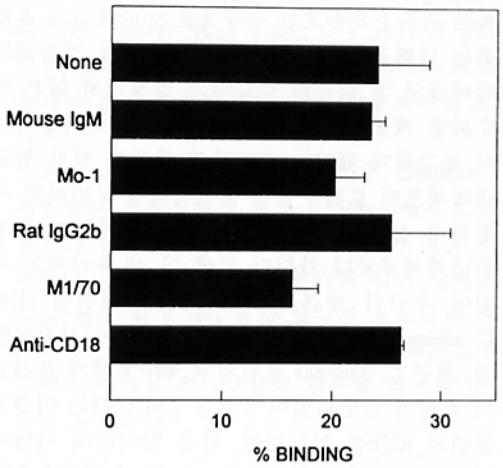

Fig. 8. Effects of anti-iC3b receptor antibody on the adhesion of *C. albicans* to HDMEC. The adhesion of *C. albicans* to HDMEC were compared after treatment with monoclonal antibody anti-Mo-l, anti-M1/70, anti-CD18, isotype immunoglobulinmouse IgM, and rat IgG2b for 45 minutes in 37.℃.

였다. HDMEC에 대한 *C. albicans*의 유착도는 항체로 처치하지 않았을때 24.1±3.7%였으며, 항 CD18 항체 첨가후에는 26.4±0.3%로 유착도에 변화를 보이지 않는 반면 iC3b수용체에 대한 항체 항 Mo-1항체 또는 M1/70항체를 첨가한 후에는 각각 20.2±2.7%와 16.5±2.2%로 감소하였다 (그림 8).

고 찰

후천성 면역결핍 증후군 환자의 증가와 각종 질환에서 장기이식술의 보편화에 따른 면역억제제의 장기간 사용으로 인해 진균 감염증의 빈도가 크게 증가하면서, 진균 감염증은 특히 면역타협 환자에서 주된 사망요인이 되고 있다[1]. 인간의 피부 및 점막의 공생진균인 *C. albicans*는 면역타협 환자에서 발생하는 전신성 진균감염증의 가장 흔한 원인균으로, 호중구 결핍증, 부신피질 호르몬제 및 광범위 항생제 투여, 정맥용 카테터 사용, 과혈당증의 선행요인이 있을때 더 흔히 감염을 유발한다[14,15].

칸디다 감염의 임상적 중요성이 점차 증대함에 따라 세포유착기전에 대한 연구가 증가하고 있고, 생체내에서 칸디다 균종의 병원성은 시험관내의 효모균 유착과 직접적으로 상관관계가 있다고 보고된 바 있으나[6], 아직도 진균유착기전에 대한 연구는 많지 않다. 칸디다 표면에 존재하는 유착분자들로는 숙주세포의 단백질과 유착하는 단백질군, 숙주 원형질막의 당과 결합하는 단백질군 및 숙주의 수용체가 밝혀지지 않은 탄수화물 배위자 등의 세가지 유형의 유착분자군이 보고되어 있다[12]. 칸디다의 감염에 의한 혈관내피세포의 보체수용체 발현변화를 보기위한 시험관내 실험에서 실험에 사용된 보체세편이 혈관내피세포보다 칸디다 균에 더 잘 유착되는 사실이 우연히 발견됨으로써[16], 보체세편에 대한 *C. albicans* 표면 수용체에 대해 연구가 시작되었고, 최근 *C. albicans* 표면의 iC3b수용체가 분리되어 특성이 규명되었다[17]. 호중구의 CR3는 미생물 표면의 iC3b를 인식하여, 균을 탐식하여 사멸시키는데 관여하는데, *C. albicans* 표면 iC3b수용체도 호중구 CR3와 항원성 및 구조가 매우 유사한 것으로 밝혀졌다[8-10].

본 연구에서 *C. albicans*의 균포자와 균사 모두에서 iC3b수용체가 발현되는 것을 관찰할 수 있었으며, 균포자에서보다 균사에서 더 강한 반응을 보였다. 이 수용체는 균사에서만 발현된다고 하는 보고도 있었으나[8], 최근 보고들에 의하면 본 연구결과와 같이 균포자와 균사에서 모두 발현되다고 하였으며, 이런 차이는 검사의 감수성 차이에 기인한다고 하였다[9,10].

숙주세포에 대한 칸디다의 유착도는 병원성이 강한 *C. albicans*와 *C. tropicalis*에서 병원성이 약한 *C. krusei*와 *C. guillermondii*보다 높고[18], 생체내에서 정상적인 조건하에서는 *C. albicans*에 비해 *C. krusei* 접종시 실험적으로 전신성 칸디다증이 잘 유발되지 않는 점[19] 등, 칸디다 균종 간에 병원성에 차이가 있음이 잘 알려져 있다. 본 연구결과에서도 병원성이 높은 균주인 *C. albicans*에서 iC3b수용체의 높은 발현율을 보인 반면 병원성이 약한 균주인 *C. parapsilosis, C. guillermondii* 등에서는 iC3b 수용체의 발현을 관찰할 수 없어 칸디다 균종간, iC3b 수용체 발현 양상에 뚜렷한 차이를 보였다. 1980년대 후반까지 *Torulopsis* 균종으로 분류되었던 *C. glabrata*는 면역타협 환자의 전신성 진균감염증의 중요한 원인균중 하나이나[14], 아직까지 *C. glabrata*에서 iC3b수용체에 관한 보고는 없었다. 문헌상 *C. albicans*와 *C. stellatoidea*에서만 iC3b수용체가 발현되는 것으로 알려져 있었다[16]. 본 연구에서 *C. glabrata*에서도 iC3b수용체가 발현되는 것을 관찰하여 향후 *C. glabrata* 감염증에서 이 수용체의 역할에 관한 연구에 중요한 자료로 이용될 것으로 생각한다. 칸디다 균종 중 상대적으로 병원성이 강한 *C. tropicalis*에서는 iC3b수용체 발현을 관찰할 수 없었는데, *C. albicans*와 *C. tropicalis*는 표피세포에 대한 유착분자가 서로 다르다는 종전의 연구결과로[20] 미루어 *C. tropicalis*에서는 iC3b수용체가 아닌 다른 병원성 인자가 있을 가능성을 생각할 수 있겠다.

칸디다 균종의 병원성과 iC3b수용체의 발현이 상관됨을 보여주는 본 연구의 결과는 칸디다 감염증의 유발에 iC3b 수용체가 중요한 역할을 할 것임을 시사하는 것이다. 분리장소에 따른 *C. albicans*의 iC3b수용체의 발현율은 혈액에서 분리한 균주가 피부 및 점막에서 분리한 균주보다 높았으나 균의 분리장소와 iC3b수용체 발현간에 통계학적 유의성은 없었다. 과혈당증과 *C. albicans* 감염과의 상관관계는 이미 오래 전부터 잘 알려져 왔으나[3], 과혈당증에서 *C. al-*

*bicans*감염의 감수성이 증가되는 정확한 기전에 대해서는 아직도 확실하게 알려져 있지 않다. 최근 이 분야에 대한 연구를 통해 포도당 농도와 비례하여 *C. albicans*의 iC3b수용체 발현이 증가한다는 것이 밝혀졌다[9,10]. 본 연구에서도 포도당의 농도에 비례하여 iC3b수용체 발현의 증가를 관찰하여 과혈당증에서 칸디다 감염증의 유발에 iC3b수용체의 발현이 관련된다는 종전의 연구결과들을 재확인 할 수 있었다[3]. 면역타협환자에서 칸디다 감염증이 증가하는 임상소견에 근거하여, 흔히 사용되는 면역억제제인 prednisolone 및 cyclopho-sphamide의 첨가 실험에서 용량의존성으로 *C. albicans*의 iC3b수용체 발현이 증가하는 것을 관찰하였다. 이들 면역억제제가 *C. albicans*의 iC3b수용체 발현에 관여할 수 있다는 흥미로운 결과를 얻었으나 면역억제제는 칸디다균에 직접 영향을 주기보다는 면역을 억제시키거나[21], 혈관을 수축시키고 혈관내피세포를 손상시켜[22] 균이 조직내 침투를 용이하게 하여 전신성 감염증의 빈도를 높이는 것으로 알려져 있어 본 실험의 결과만으로는 정확한 의미를 논하기는 어렵다. 향후 이에 대한 보완적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

단클론 항체를 이용하여 *C. albicans* 표면 iC3b 수용체를 차단한 실험에서 *C. albicans*에 대한 식균작용이 현저히 증가됨이 보고되었다[9]. iC3b수용체는 옵소닌 제거, 칸디다균의 응집촉진, 식균작용 저하 등의 작용으로 전신성 칸디다 감염증의 발병기전에 중요한 역할을 할 것으로 생각되어 왔다. 최근 Gustafson 등[23]은 배양한 HUVEC 단층을 이용한 *C. albicans*의 유착실험에서 배양액의 포도당 농도 증가에 따라 HUVEC에 대한 *C. albicans*의 유착이 증가하고, 인체의 호중구 CD11b/CD18 유착분자의 α unit에 대한 단클론 항체에 의해 억제됨을 보고하면서 iC3b 수용체가 배양된 HUVEC과 *C. albicans*간의 유착에 관여하는 유착분자의 하나임을 시사하였다. 유래된 혈관의 크기나 종류에 따라 혈관 내피세포의 특성에 뚜렷한 차이가 있음이 보고된 바 있고[13,24,25], *C. albicans*가 피부 및 점막에 잘 감염되는 점에 착안하여 본 연구에서는 피부로부터 분리 배양한 HDMEC에 대한 유착실험을 시행하였다. 본 연구에서는 포도당의 농도에 비례하여 HDMEC에 대한 *C. albicans*의 유착도가 증가하였다, 유착도의 증가는 유착반응시간과 *C. albicans*의 수에 비례하였으며, iC3b수용체 대한 단클론 항체에 의해 32%의 감소를 보였다. 이러한 실험결과는 HUVEC을 이용한 종전의 실험결과와[23] 유사한 소견으로서 정상인에 비해 과혈당증 환자에서 *C. albicans*가 혈관벽의 내피세포에 더 잘 부착할 수 있음을 시사하는 소견이며, 과혈당증 환자에서 혈행성 칸디다증이 빈발하는 현상과 부합된다고 하겠다. iC3수용체의 각기 다른 에피토프를 인식하는 iC3b에 대한 단클론 항체를 이용한 유척저해 실험 결과 항 Mo-1 항체보다 M1/70 항체를 이용하였을 때 유착도가 더욱 감소하였다. 이러한 결과는 iC3b 수용체의 각기 다른 epitope에 대한 항 iC3b수용체 항체들간의 친화도 차이에 기인하거나 *C. albicans*의 추출물에 대한 면역블롯검사 및 면역침강 검사상 항 iC3b수용체 항체에 반응하는 130kD, 100kD, 50kD[11], 165kD[10]의 단백질이 분리된 보고들로 미루어 *C. albicans*와 HDMEC의 유착에 관여하는 iC3b수용체의 염기서열 부위의 포함정도에 따른 에피토프간의 차이에 의할 가능성을 생각할 수 있다. 아직까지 칸디다 iC3b수용체에 대한 숙주세포의 배위자는 아직 확실히 밝혀져 있지 않으며, 호중구의 iC3b수용체에 대한 배위자로서 알려져 있는 intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1)은 *C. albicans* iC3b수용체와의 유착에는 관여하지 않을 것으로 보고된 바 있다[23,26]. 혈관 내피세포에서 C3가 합성되는 것으로 알려져 있어[33], 혈청이나 세포내에 존재하는 단백질 분해효소에 의해 C3가 분해된 후 국소적으로 iC3b가 생성되어 혈관 내피세포 표면에 부착된 후 칸디다 iC3b수용체의 배위자로 작용할 가능성이 제시되고 있다[23,27,28].

본 연구에서 배양한 HDMEC과 *C. albicans*간의 시험관내 유착실험을 통해 *C. albicans*의 iC3b수용체가 유착과정에 작용할 수 있다는 것을 확인하였다. 본 시험관내 실험결과와 같이 생체내에서도 혈중 항 iC3b수용체 항체가 효모균과 숙주 내피세포간 유착을 차단한다면, 혈액으로부터 주변 조직으로 칸디다균의 침윤을 억제할 수 있음을 시사한다.

결 론

본 연구에서 면역형광검사와 면역형과 유량세포분석법을 시행하여 포도당 및 면역억제제에

의한 C. albicans의 표면 iC3b수용체의 발현변화를 관찰하고 배양한 HDMEC에 대한 C. albicans의 유착실험을 통해 포도당 및 항 iC3b수용체 항체가 HDMEC과 C. albicans의 유착에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 면역형광검사와 면역형광 유량세포 분석법으로 C. albicans에서 iC3b수용체 분자의 표면 발현을 관찰할 수 있었다.

2. C. albicans 표면 iC3b수용체의 발현은 C. albicans배양배지내 포도당 농도, cyciophosphamide와 prednisolone 농도에 비례하여 용량의존성으로 증가하였다.

3. HDMEC에 대한 C. albicans의 유착정도는 C. albicans의 배양배지내 포도당 농도에 비례하여 증가하였다.

4. HDMEC에 대한 C. albicans의 유착정도는 iC3b수용체에 대한 항체로 전처치한 실험군에서 유의하게 감소하였다.

이상의 결과로 보아 iC3b수용체가 혈관 내피세포에 대한 C. albicans의 유착에 작용하여, 혈행성 파종성 칸디다증의 발병기전에 관여할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Radentz WH. *Opportunistic fungal infections in immunocompromised hosts.* J Am Acad Dermatol 1989; 20: 989-1003
2. Anaissie E. *Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: experience at a cancer center and review.* Clin Infect Dis 1992; 14(suppl): 43-53
3. Horn R, Wong B, Kiehn TE, Armstrong *D. Fungemia in a cancer hospital: changing frequency, earlier onset, and results of therapy.* Rev Infect Dis 1985; 7: 646-655
4. Beachey EH. *Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces.* J Infect Dis 1981; 143: 325-345
5. Freter R, Jones *GW. Models for studying the role of bacterial attachment in viulence and pathogenesis.* Rev Infect Dis 1983; 5: s647-s658
6. Scheld WM, Strunk RW, Balian G, Calderone RA. *Microbial adhesion to fibronectin in vito correlates with production of endocarditis in rabbits.* Proc Soc Exp Biol Med 1985; 180: 474-482
7. Ross GD. *Analysis of the different types of leukocyte membrane complement receptors and their interaction with the complement system.* J Immunol Methods 1980; 37: 197-211
8. Edwards JE Jr., Gaither TA, O'Shea JJ, et al. *Expression of specific binding sites on Candida with functional and antigenic characteristics of human complement receptors.* J Immunol 1986; 137: 3577-3583
9. Gilmore BJ, Retsinas EM, Lorenz JS, Hostetter MK. *An iC3b receptor on Candida albicans: structure, function, and correlates for pathogenicity.* J Infect Dis 1988; 157: 38-46
10. Hostetter MK, Lorenz J, Preus L, Kendrick KE. *The iC3b receptor on Candida albicans: subcellular localization and modulation of receptor expression by glucose.* J Infect Dis 1990; 161: 761-768
11. Eigentler A, Schlz TF, Larcher C, et al. *C3bi-binding protein on Candida albicans: temperature-dependent expression and relationship to human complement receptor type 3.* 1989; Infect Immun 57: 616-622
12. Calderone RA, Braun PC. *Adherence and receptor relationships of Candida albicans.* Microbiol Rev 1991; 55: 1-20
13. Lee KH, Lawley TJ, Xu Y, Swerlick RA. *VCAM-1, ELAM-1, and ICAM-I independent adhesion of melanoma cells to cultured human dermal microvascular endothelial cells.* J Invest Dermatol 1992; 98: 79-85
14. Wajszczuk CP, Dummer JS, Ho M. *Fungal infections in liver transplant recipients. Transplantation.* 1985; 40: 347-353
15. Bodey GP. *Fungal infection and fever of unknown origin in neutropenic patients.* Am J Med 1986; 80: 112-119
16. Heidenreich F, Dierich MP. *Candida albicans and Candida stellatoidea in contrast to other Candida species, binds iC3b and C3d but not C3b.* Infect Immun 1985; 50: 598-600
17. Alaei S, Larcher C, Ebenbichler C, et al. *Iso-*

lation and biochemical characerization of the iC 3b receptor of Candida albicans. Infect Immun 1993; 61: 1395-1399

18. Rotrosen D, Calderone RA, Edwards JE Jr. *Adherence of Candida species to host tissues and plastic surfaces.* Rev Infect Dis 1986; 8: 73-85
19. Anaissie E, Hachem R, KTinU C, Stephens LC, Bodey GP. *Experimental hematogeneous candidiasis caused by Candida krusei and Candida albicans: species differences in pathogenicity.* Infect Immun 1993; 61: 1268-1271
20. Bendel CM, Hostetter MK. *Distinct mechanisms of epithelial adhesion for Candida albicans and Candida tropicalis: identification of the participating ligands and development of inhibitory peptides.* J Clin Invest 1993; 92: 1840-1849
21. Greenfield RA. *Host defense system interactions with Candida.* J Med Vet Mycol 1992; 30: 89-104
22. Nicolson GL, Custead SE. *Effects of chemotherapeutic drugs on platelet and metastatic tumor cell interactions as a model for assessing vascular endothelial integrity.* Cancer Res 1985; 45: 331-336
23. Gustafson KS, Vercellotti GM, Bendel CM, Hostetter MK. *Molecular mimicry in Candida albicans: role of an integrin analogue in adhesion of the yeast to human endothelium.* J Clin Invest 1991; 87: 1896-1902
24. Swerlick RA, Lee KH, Li SJ, Caughmann SW, Lawley TJ. *Regulation of vascular cell adhesion molecule 1 on human dermal microvascular endothelial cells.* J Immunol 1992; 149: 698-705
25. Swerlick RA, Lee KH, Wick TM, Lawley TJ. *Human dermal microvascular endothelial but not human umbilical vein endothelial cells express CD36 in vivo and vitro.* J Immunol 1992; 148: 78-83
26. Lo SK, Van Seventer GA, Levin SM, Wright SD. *Two leukocyte receptors(CD11 a/CD18 and CD11b/CD18) mediate transient adhesion to endotheli1lm by binding o different ligands.* J Immunol 1989; 143: 3325-3329
27. Brooimans RA, van der Ark AA, Buurman WA, van Es LA, Daha MR. *Differential regulation of complement factor H and C3 production in human umbilical vein endothelial cells by IFN-γ* and IL-1. J Immunol 1990; 144: 3835-3840
28. Wright SD, Reddy PA, Jong MCT, Erickson BW. *C3bi receptor(complement receptor type 3) recognizes a region of complement protein C3 containing the sequence Arg-Gly-Asp.* Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 1965-1968